



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**CAMPUS BAIXADA SANTISTA**



Stephanie de Souza Fermino

**Efeitos da laserterapia sobre o processo de reparo ósseo  
em ratos sob influência da ingestão crônica de álcool**

**SANTOS - SP**

**2017**

STEPHANIE DE SOUZA FERMINO

EFEITOS DA LASERTERAPIA SOBRE O PROCESSO DE REPARO ÓSSEO  
EM RATOS SOB INFLUÊNCIA DA INGESTÃO CRÔNICA DE ÁLCOOL

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a  
Universidade Federal de São Paulo, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
bacharel em Fisioterapia.

**Orientadora:** Me. Angela Maria Paiva Magri

**Co-orientadoras:** Profa. Dra. Ana Cláudia  
Muniz Renno e Profa. Dra. Isabel Cristina  
Céspedes

SANTOS - SP

2017

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir sonhar, viver e amar cada passo desta trajetória afim da realização deste sonho. A Tua bondade, cuidado e amor me inspiram dão forças.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, compreensão, confiança, apoio e por acreditarem também nos meus sonhos e planos. Esse caminho que escolhi não estaria sendo percorrido sem vocês. Não existem palavras que possam expressar minha gratidão por toda a vida. Amo vocês e sem limites!

Á minha irmã Helen pela parceria, companheirismo, força e torcida positiva de sempre. Você é uma daquelas minhas poucas certezas da vida. Amo muito você e obrigada por tudo!

Ao meu cunhado Thiago, pela amizade verdadeira e amor com toda a família. Obrigada!

Á minha orientadora, Angela Magri, pelo cuidado, paciência, ensinamentos, disponibilidade e pelos cafés dessa trajetória. Tenho um imenso carinho e admiração por você. Muitíssimo obrigada!

Ás minhas co-orientadoras Ana Claudia Renno e à querida Isabel Céspedes! Obrigada pelo acolhimento, orientação e atenção.

Ao Chicão, grande parceiro, técnico do laboratório de anatomia que muito me ensinou como monitora e, depois, mais uma vez como aluna de IC, com toda a parte experimental deste longo trabalho. Obrigado pela alegria, conhecimento compartilhado e parceria de todos os dias.

Aos colegas dos laboratórios de Neurofisiologia do Estresse e LaBETec pelos quais passei e tanto aprendi. Muitíssimo obrigada por todas contribuições!

Aos amigos e familiares de São José dos Campos, que continuaram comigo mesmo com a distância e as ausências físicas em tantos momentos. Obrigada pelo incentivo, amizade e companheirismo de anos!

Aos meus amigos que fiz aqui em Santos, que se tornaram minha família, meu refúgio e fizeram desses anos todos, uma fase maravilhosa, cheia de aprendizados, crescimento e momentos que não serão esquecidos. Muito obrigada!

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e todos os funcionários desta, pelo suporte tão importante durante a realização da pesquisa.

E para que não corra o risco de ser ingrata, a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho - que marca uma pequena fase da minha trajetória - meu muitíssimo obrigada!



## RESUMO

O consumo crônico de álcool está associado com estadias prolongadas em hospitais, alto número de encaminhamentos para unidades de terapia intensiva e prejuízo durante o processo de reparo tecidual, como o processo de reparo ósseo. O consumo crônico de álcool diminui a formação óssea através da inibição da função dos osteoblastos, além de alterar as vias de sinalização relacionadas à resposta inflamatória. Desta forma, se faz necessário a investigação de tratamentos que apresentem um potencial osteogênico e que tenham a capacidade de estimular o processo de reparo ósseo em alcoólatras. Um recurso eletrofísico que vêm se destacando pelo seu potencial osteogênico é o laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT). Existem evidências de que o LLLT é capaz de estimular células ósseas e acelerar o processo de reparo. No entanto, ainda não há estudos que suportem esta promissora intervenção terapêutica em modelos experimentais de ingestão crônica de álcool. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do LLLT durante o processo de reparo ósseo de ratos submetidos a ingestão crônica de álcool. Para isso, 30 ratos machos *Wistar* adultos foram divididos em três grupos: controle (n = 10), álcool (n = 10) e álcool + LLLT (n = 10). Ainda, cada grupo foi subdividido em dois grupos contendo 5 animais cada, um para análise em 7 dias e outro para análise em 14 dias após a lesão. A administração do álcool foi realizada pelo protocolo do paradigma de duas garrafas, com acesso a uma garrafa de água e outra contendo solução de álcool 20%, 3 dias por semana durante 45 dias. As garrafas de álcool foram medidas e pesadas 24 h após serem ofertadas e os dois grupos submetidos ao protocolo de administração oral de álcool tiveram uma amostra de sangue coletada ao final do experimento para verificação dos níveis séricos de etanol. Foram realizadas análises histopatológicas, morfométricas e imunohistoquímicas de Runx-2. Na dosagem e análise morfométrica não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. A análise histopatológica mostrou que os grupos laser apresentaram melhor organização tecidual, com intensa neoformação óssea comparado ao grupo álcool, em ambos períodos experimentais estudados. Houve aumento significativo na análise semi-quantitativa de Runx2 nos animais alcoólatras tratados com laser, 7 dias após a lesão. Em conclusão, o LLLT foi capaz de estimular o metabolismo ósseo em ratos sob ingestão crônica de álcool e sugere-se que ele acelere a reparação óssea nesta população.

**Palavras-chave:** álcool, defeito ósseo, laser terapêutico de baixa intensidade, reparo ósseo.

## ABSTRACT

Chronic alcohol consumption is associated with prolonged hospital stays, high number of referrals to intensive care units and harm in the tissue repair process. Excessive chronic alcohol consumption decreases bone formation through a direct toxic effect on the function of osteoblasts, besides changing the signaling pathways related to the inflammatory response. Thus, it is necessary to investigate the treatments which present an osteogenic potential and are able to accelerate the process of bone repair in alcoholics. The Low-level laser therapy (LLLT) is a widely used resource for accelerating bone metabolism. There is evidence that LLLT can stimulate bone cells and accelerate the repair process, but there are no studies that support the implementation of this promising therapeutic intervention in the bone tissue of experimental models on chronic alcohol intake. The present study aimed to evaluate the effects of LLLT in the bone repair process in rats undergoing chronic excessive alcohol intake. For this purpose, thirty Wistar rats were submitted to a surgical procedure to perform bone defect and distributed into three groups: control (n = 10), alcohol (n = 10) and alcohol + LLLT (n = 10). Each group was divided into two groups of 5 animals each, for analysis 7 days post-lesion and another 14 days post-lesion. Alcohol administration was held by the two bottles protocol with access to a water bottle and other alcohol bottle, containing solution 20%, 3 days a week for 45 days. Alcohol bottles were measured and weighed 24 hours after being offered. The two groups (n = 20) undergoing the oral administration protocol alcohol had a blood sample collected at the end of the experiment to check the serum levels of ethanol. Histopathological, morphometric and immunohistochemical analyses of Runx-2 were performed. In the dosage and morphometric analysis no significant differences were observed between the groups. The histopathological analysis showed that the laser groups presented better tissue organization, with intense bone neoformation compared to the alcohol group, in both experimental periods studied. There was a significant increase in the semi-quantitative analysis of Runx2 in alcoholic animals treated with laser, 7 days after the injury. In conclusion, LLLT showed an osteogenic potential in rats under chronic alcohol intake and it is suggested that it accelerate bone repair in this population.

**Keywords:** alcohol, bone defect, low-level laser therapy, bone repair

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

BMP – Proteína morfogenética óssea

BV/TV – Relação entre o volume de osso neoformado por volume da área de defeito

CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas

CEUA - Comitê de ética no uso de animais

cm<sup>2</sup> - centímetros quadrados

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DMO – Densidade Mineral Óssea

DNA – Ácido desorribonucleico

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetraacético

EPM – Erro padrão da média

EtOH – Etanol

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FGF - fator de crescimento de fibroblastos

GA – Grupo álcool

GaAlAs - semicondutor Diodo de Arseneto de Gálio-Alumínio

GAL – Grupo álcool + *Low level laser therapy*

GC – Grupo controle

H.E – Hematoxilina eosina

IA2BC - Intermittent-access to 2 bottle choice

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

J/cm<sup>2</sup> - Joule por centímetro quadrado

*Laser* - Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

LLLT - *Low Level Laser Therapy*

mg/kg/24h – miligramas por quilograma durante 24h

N – quantidade de amostras

Ob – Osteoblastos

Oc – Osteoclastos

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPG - Osteoprotegina



PBS - Phosphate-Buffered Saline

RANK-L - Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand

RNA – Ácido ribonucleico

Runx-2 - fator de transcrição relacionado à Runt do tipo 2

S - segundos

TNF  $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

V - Volt

W – Watt

% - porcentagem

+ - mais

< - menor

= igual

> - maior

$\mu\text{m}$  – Micrômetro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema demonstrativo dos grupos experimentais e organização cronológica dos protocolos experimentais.....	21
Figura 2. Aparelho Photon lase III (DMC® equipamentos) utilizado neste estudo. ....	23
Figura 3. Esquema demonstrativo do corte histológico do modelo de defeito ósseo adotado neste estudo. (Coloração: HE; Aumento: 5x; Escala: 500 µm) .....	25
Figura 4. Análise da fração de volume de osso neoformado em área de defeito obtida através do Software <i>OsteoMeasure</i> . ....	26
Figura 5. Médias ± EPM semanais do peso em quilogramas dos grupos analisados 7 dias após o defeito ósseo. Teste de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn. $p \leq 0,05$ . ....	28
Figura 6. Médias ± EPM semanais do peso em quilogramas dos grupos analisados 14 dias após o defeito ósseo. Teste de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn. $p \leq 0,05$ . ....	28
Figura 7. Médias ± EPM do consumo semanal de álcool em g/kg/24h dos grupos GA7 e GAL7. Teste Mann Whitney. $p \leq 0,05$ . ....	29
Figura 8. Médias ± EPM do consumo semanal de álcool em g/kg/24h dos grupos GA7 e GAL7. Teste Mann Whitney. $p \leq 0,05$ . ....	29
Figura 9. Médias ± EPM dos níveis séricos de álcool final do período experimental de 7 dias. Teste Mann Whitney. $p \leq 0,05$ . ....	30
Figura 10. Médias ± EPM dos níveis séricos de álcool final do período experimental de 7 dias. Teste Mann Whitney. $p \leq 0,05$ . ....	30
Figura 11. Defeito ósseo. A, B: animais sem tratamento (GC7 e GC14); C, D: animais submetidos à ingestão crônica de álcool (GA7 E GA14); E, F: submetidos à ingestão crônica de álcool e irradiados com LLLT (GAL7 e GAL14). Infiltrado inflamatório (#); tecido ósseo neoformado (*); tecido medular (seta vermelha). Coloração HE; Aumento 20x; Escala: 200 µm. ....	32
Figura 12. Médias ± EPM do volume ósseo neoformado (%) na região do defeito ósseo 7 dias após a cirurgia. GC: controle; GA: álcool; GAL: álcool + laser. ANOVA <i>One-Way</i> seguida de <i>post-hoc</i> de Tukey. $p \leq 0,05$ . ....	33
Figura 13. Médias ± EPM do volume ósseo neoformado (%) na região do defeito ósseo 14 dias após a cirurgia. GC: controle; GA: álcool; GAL: álcool + laser. ANOVA <i>One-Way</i> seguida de <i>post-hoc</i> de Tukey. $p \leq 0,05$ . ....	33

Figura 14. Fotomicrografias representativas no aumento de 400x da análise imuno-histoquímica dos defeitos ósseos. A, B: animais sem tratamento (GC7 e GC14); C, D: animais submetidos à ingestão crônica de álcool (GA7 E GA14); E, F: submetidos à ingestão crônica de álcool e irradiados com LLLT (GAL7 e GAL14). (*) Indica imunomarcação de Runx-2. Escala: 100 $\mu$ m.....	34
Figura 15. Médias $\pm$ EPM da análise semi-quantitativa da imunoexpressão de Runx-2 7 dias após a cirurgia. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. *p = 0,0201; GAL vs GC.....	35
Figura 16. Médias $\pm$ EPM da análise semi-quantitativa da imunoexpressão de Runx-2 14 dias após a cirurgia. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. p $\leq$ 0,05. ....	35

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Parâmetros da aplicação de LLLT.....	23
--	----

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	8
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	12
SUMÁRIO .....	13
1.....INTRODUÇÃO	15
1.1. Ingestão de Álcool e Resposta do Tecido Ósseo .....	15
1.2. Laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT) .....	17
2. OBJETIVO.....	18
2.1. Objetivo Geral .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2. Objetivos Específicos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. Estudo <i>in vivo</i> .....	19
3.2. Grupos experimentais.....	19
3.3. Protocolo de ingestão crônica de álcool: Intermittent-access to 2 bottle choice (IA2BC) .....	21
3.4. Modelo experimental de defeito ósseo na tíbia .....	22
3.5. Tratamento com Laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT).....	22
3.6. Eutanásia e coleta do material .....	23
3.7. Análises .....	24
3.7.1. Análise da ingestão de álcool .....	24
3.7.2. Análise dos níveis séricos de etanol .....	24
3.7.3. Análise histopatológica qualitativa .....	24
3.7.4. Análise morfométrica .....	25
3.7.5. Análise imuno-histoquímica .....	26
3.7.6. Análise estatística .....	27
4. RESULTADOS .....	27

4.1. Achados gerais .....	27
4.2. Peso dos animais .....	27
4.3. Análise da ingestão de álcool .....	28
4.4. Análise dos níveis séricos de álcool .....	29
4.5. Análise histopatológica .....	30
4.5.1. Sete dias após a realização do defeito ósseo .....	31
4.5.2. Catorze dias após a realização do defeito ósseo .....	31
4.6. Análise morfométrica .....	32
4.7. Análise imuno-histoquímica .....	33
5. DISCUSSÃO .....	35
6. CONCLUSÃO .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Ingestão de Álcool e Resposta do Tecido Ósseo

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em seu Relatório Global Sobre Álcool e Saúde de 2014, o álcool foi considerado uma das substâncias psicoativas que mais produzem dependência, tem sido amplamente utilizado em muitas culturas ao longo dos séculos e seu consumo crônico pode causar doenças de grande impacto socioeconômico. Neste mesmo relatório apresentado, o Brasil supera a média das Américas em relação ao consumo anual de álcool puro por habitante com idade superior a 15 anos.

Ainda, um estudo, realizado pelo Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), revelou que 74,6% da população brasileira consome álcool durante a vida, sendo que 12,3% são dependentes e 7,3% envolvem-se em alguma situação de risco a saúde em decorrência do uso da bebida alcoólica (CARLINI *et al.*, 2007).

Mais de 70 milhões de pessoas no mundo possuem algum transtorno de saúde diagnosticado por uso excessivo de álcool (OMS, 2004). Mundialmente, o consumo de álcool é o quinto principal fator de risco de morte prematura ou incapacidade entre pessoas que estão na faixa etária de 15 a 49 anos (LIM *et al.*, 2012). Além disso, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CPD) evidenciaram que em 2006, o consumo excessivo de álcool custou aos Estados Unidos mais de US \$ 224 bilhões, tornando-se um dos problemas de saúde públicas mais caros da atualidade para diversos países desenvolvidos e/ou em desenvolvimento (BOUCHERY *et al.*, 2011).

Em adição, o alto consumo de álcool tem sido associado com estadias prolongadas em hospitais e aumento dos casos de encaminhamento para unidades de terapia intensiva. Embora esses achados tenham base multifatorial, o uso crônico de álcool também é considerado um fator de risco independente para o desenvolvimento de infecções, choque séptico e morte relacionada a infecções crônicas ou agudas em pacientes doentes (O'BRIEN *et al.*, 2007; SZABO & MANDREKAR, 2009). Com isso, a literatura científica atual tem documentado amplamente os efeitos do uso excessivo do álcool, principalmente por estar associado a uma queda no sistema de defesa do organismo, com ênfase em alterações e prejuízos nos processos de reparo tecidual (COOK, 1998; PAVIA *et al.*, 2004).

A combinação entre o consumo de álcool e uma lesão tecidual tem demonstrado significativa interferência nas vias de sinalização envolvidas no início e controle da resposta

inflamatória (GREIFFENSTEIN & MOLINA, 2008). As alterações na resposta inflamatória desencadeadas pelo consumo de álcool levam a alterações na produção de citocinas e quimiocinas (JUNG *et al.*, 2011), o que conseqüentemente, acarreta em prejuízos no processo de reparo tecidual, incluindo o tecido ósseo (SWEARINGEN *et al.*, 2010).

No tecido ósseo, as complicações advindas do processo de consolidação refletem diretamente na perda da produtividade e independência do indivíduo (AARON *et al.*, 2004). Ainda, há um aumento dos gastos públicos, no qual cerca de 25 mil dólares são gastos em um caso de pseudoartrose nos Estados Unidos (WIESE & PAPE, 2010). No Brasil, ainda há dados que apontem os gastos públicos em relação as complicações advindas de casos que não houve união óssea ou culminou em pseudotrose. No entanto, sabe-se que quanto mais prologado o processo de reparo, maiores serão as chances de desenvolver complicações, e assim, elevar os gastos com os tratamentos (REIS *et al.*, 2008). Além disso, as fraturas entre alcoólatras são achados comuns, especialmente fraturas de costela, muitas vezes bilateral ou múltipla. Israel *et al.* (1980) observaram fraturas nas costelas e vértebras de 57 de 198 pacientes de um grupo de alcoólatras, contra apenas 4 dos 218 indivíduos do grupo controle. A intoxicação por álcool aparece em 25-40% dos pacientes traumáticos com lesões ortopédicas associadas, e o número de fraturas em alcoólatras é até quatro vezes maior que em indivíduos não-alcoólatras, destacando uma forte relação entre traumas ósseos nesta população (BLAKE *et al.*, 1997; KRISTENSSON *et al.*, 1980). Há ainda um recente estudo de Marley *et al.* (2015) realizado em um hospital de Londres que observou um aumento dos encargos financeiros decorrente de fraturas em alcoólatras quando comparadas às mesmas lesões em indivíduos saudáveis.

Ainda, estudos clínicos têm associado o abuso de álcool ao risco significativamente maior de desenvolver uma não união e/ou atraso na consolidação da fratura (FOULK & SZABO, 1995; PERLMAN & THORDARSON, 1999; MATHOG *et al.*, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2008.; DUCKWORTH *et al.*, 2011). Adicionalmente, estudos utilizando modelos animais expostos ao consumo excessivo de álcool e lesão óssea, relataram observações semelhantes (JÄNICKE-LORENZ & LORENZ, 1984; CHAKKALAKAL *et al.*, 2005; TREVISIOL *et al.*, 2007). Estudos apontam que o consumo excessivo de álcool combinado com tabagismo e má alimentação, provoca respostas negativas sobre o tecido ósseo, incluindo redução da proliferação celular (GIULIANI *et al.*, 1999; VIGNESH *et al.*, 2006), interrupção da sinalização endócrina relacionada a este tecido (TURNER *et al.*, 2010) e redução da densidade mineral óssea (DMO) (VERNEJOUL *et al.*, 2007; CHAPPARD *et al.*, 1991).

Segundo Turner (2000), o etanol, quando consumido em excesso, diminui a formação óssea através de um efeito tóxico direto sobre a função e ativação dos osteoblastos. Este fato



acarreta em uma inibição da formação óssea em animais e possivelmente em seres humanos (DIAMOND *et al.*, 1989; WEZEMAN *et al.*, 2000). Ainda, estudos demonstram uma diminuição dos níveis séricos de osteocalcina em alcoólatras (DIAMOND *et al.*, 1989; ALVISA-NEGRÍN *et al.*, 2009; SANTORI *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* revelaram que a ingestão crônica excessiva de álcool é capaz de diminuir a diferenciação e proliferação de células osteoblásticas e alterar a atividade de fosfatase alcalina (CHAVASSIEUX *et al.*, 1993; CHEUNG *et al.*, 1995; SUH *et al.*, 2005). Em adição, entre alcoólatras, é comum encontrar os níveis de fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e de interleucina 1 (IL-1) mais altos, o que se deve a ativação de células de Kupffer por bactérias gram-negativas intestinais que atingem o sistema portal, devido ao aumento da permeabilidade intestinal mediada pelo etanol (CREWS *et al.*, 2006). Além disto, quando TNF- $\alpha$  e IL-1 estão aumentadas há formação de mais espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuição da expressão de genes de osteoprotegina (OPG) e morte apoptótica de osteócitos. Como consequência, há elevada expressão de receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B ligante (RANKL) e diminuição da DMO, devido ativação osteoclastogênese (HOFBAUER, 1999; CHEN JR *et al.*, 2011; CHEN Y *et al.*, 2013; MAUREL *et al.*, 2012). Além disso, o excesso de álcool no sangue pode aumentar os níveis de paratormônio (PTH) e desordenar, ou muitas vezes reduzir, o metabolismo da vitamina D (BIKLE *et al.*, 1985; GONZALEZ-CALVIN *et al.*, 1993; ATKINS *et al.*, 2007).

Diante das evidências apontadas, visto que o reparo ósseo é um processo complexo e que o consumo excessivo de álcool ocasiona um retardo na consolidação óssea (DIAMOND *et al.*, 1989; CHAVASSIEUX *et al.*, 1993; CHEUNG *et al.*, 1995; WEZEMAN *et al.*, 2000; MADDALOZZO *et al.*, 2009), vários recursos são utilizados para estimular o metabolismo ósseo, como a aplicação do LLLT (MEHTA *et al.*, 2010). Este recurso eletrofísico vem se destacando por suas propriedades osteogênicas durante o processo de reparo ósseo, sendo capaz de modular o processo inflamatório e estimular a diferenciação e proliferação dos osteoblastos, assim, acelerar a neoformação óssea (FERNANDES *et al.*, 2013; TIM *et al.*, 2013; MAGRI *et al.*, 2015).

## **1.2. Laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT)**

A sigla *laser* significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação”. Os *lasers* são ondas eletromagnéticas amplificadas que possuem propriedades especiais com efeitos na cinética do reparo tecidual (LOW & REED, 2009).

O mecanismo de ação do LLLT está baseado na absorção da luz pelos tecidos, que gera uma série de modificações no metabolismo celular. A luz emitida é absorvida pelos cromóforos, mais especificamente, pelo citocromo c oxidase, localizado no complexo IV das mitocôndrias. Após esta bioestimulação, várias reações bioquímicas específicas são ocasionadas, que resultam, principalmente, no aumento da síntese de trifosfato de adenosina (ATP) (DORTBUDAK *et al.*, 2000; KARU *et al.*, 2000; STEIN *et al.*, 2005). Esses efeitos culminam no aumento da síntese de DNA, RNA e no ciclo celular regulatório das proteínas, promovendo um aumento da proliferação celular (RENNO *et al.*, 2007).

Investigações *in vitro* como a de Fujimoto *et al.* (2010) e Kiyosaki *et al.* (2010) demonstraram que o uso LLLT acelerou a proliferação e diferenciação celular, aumentou positivamente a atividade da fosfatase alcalina, osteocalcina, fator de transcrição relacionado à Runt do tipo 2 (Runx-2) e a expressão de proteína morfogenética óssea (BMP) em osteoblastos.

Adicionalmente, diversos autores observaram, através de trabalhos experimentais, que o LLLT é capaz de aumentar o nível de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), mediador importante para um aumento da taxa de proliferação e maturação de osteoblastos e secreção de matriz óssea (NASCIMENTO *et al.*, 2010; FÁVARO-PÍPI *et al.*, 2011). Em adição, Fávaro-Pípi *et al.* (2010) demonstraram que durante a consolidação óssea o LLLT favoreceu o reparo, evidenciado por um aumento de trabéculas maduras, deposição de tecido ósseo e tecido conjuntivo altamente vascularizado. Bossini *et al.* (2012) observaram que o LLLT foi um potente bioestimulador da neoformação óssea e aumento da síntese de deposição de colágeno em ratas osteopênicas.

Embora existam evidências de que o LLLT seja capaz de estimular células ósseas e acelerar o processo de reparo, a aplicação desse recurso no tecido ósseo em modelos experimentais de ingestão de álcool não é explorada. Assim, estudos como este são extremamente importantes para que o tempo de reparo ósseo seja otimizado. Além disto, é necessária a definição de protocolos para este tipo de tratamento, para que assim, sejam cada vez mais seguros e efetivos.

Sendo assim, a hipótese do presente estudo é de que o laser module o processo inflamatório, aumente a atividade dos osteoblastos e consequentemente, aumente a deposição de tecido ósseo neoformado e acelere o processo de reparo ósseo.

## 2. OBJETIVO

Analisar os efeitos do LLLT (120J/cm<sup>2</sup>) sobre o processo de reparo ósseo na tíbia de ratos sob a influência da ingestão crônica de álcool a 20%, de forma intermitente por 45 dias, em períodos experimentais de 7 e 14 dias após realização do defeito ósseo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado no Laboratório de Biomateriais e Engenharia Tecidual, do departamento de Biociências da UNIFESP, Campus Baixada Santista.

#### **3.1. Estudo *in vivo***

Trinta ratos machos da linhagem *Wistar* com 2 meses de idade e peso corporal médio de 280 g provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais – CEDEME (número: 1) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) foram mantidos na Guarda de Animais (número: 5) da UNIFESP – *Campus* Baixada Santista. Os animais foram alimentados com ração comercial e água a vontade, mantidos em regime de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e temperatura controlada a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFESP (Parecer n° 9613270815, Anexo 1).

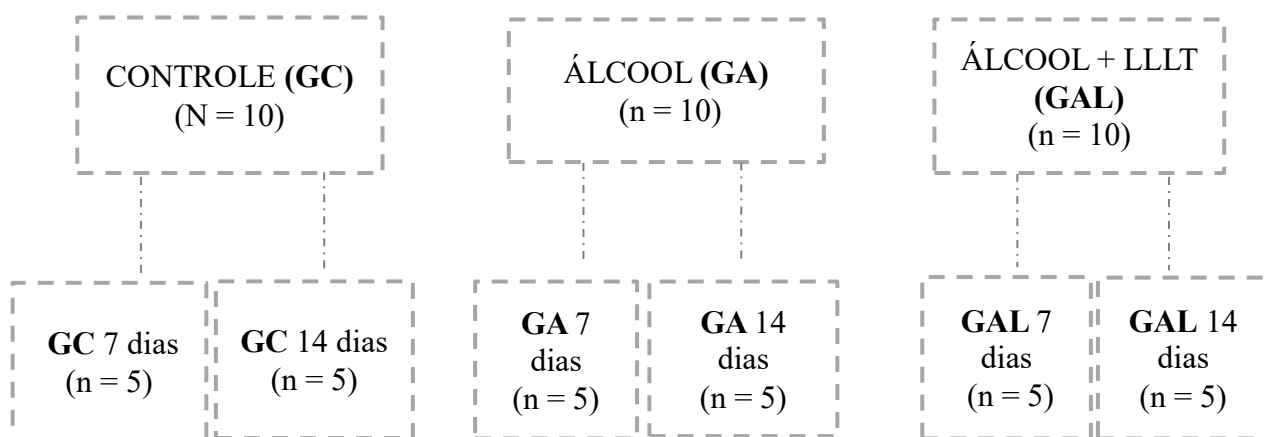
#### **3.2. Grupos experimentais**

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (n =10/grupo).

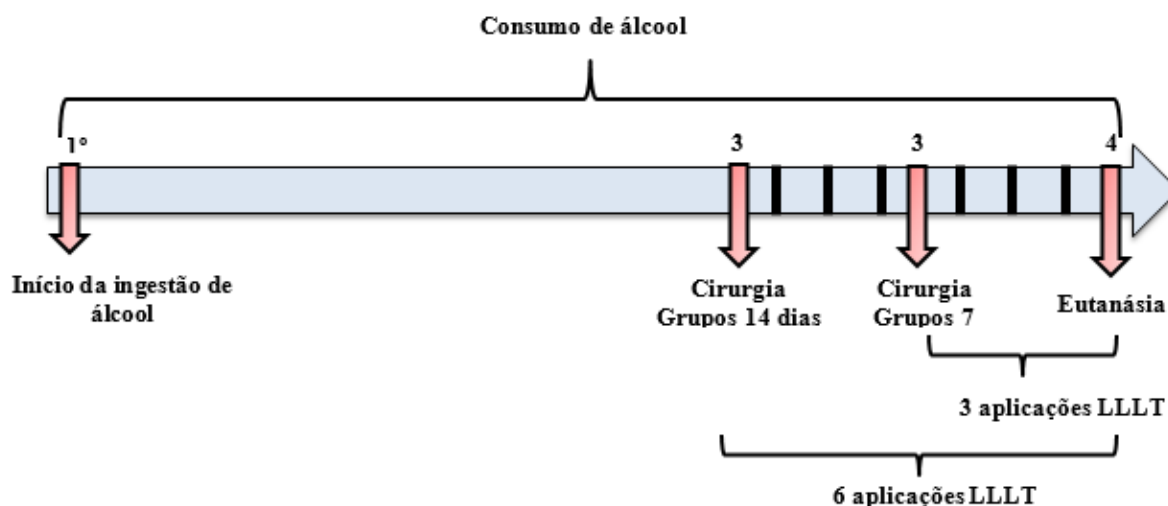
- **GC:** Os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico para confecção de um defeito ósseo em ambas as tíbias e não receberam nenhum tipo de tratamento.

- **GA:** Os animais deste grupo foram submetidos ao protocolo de ingestão crônica de álcool e ao procedimento cirúrgico para confecção de um defeito ósseo em ambas as tíbias e não receberam nenhum tipo de tratamento.
- **GAL:** Os animais deste grupo foram submetidos ao protocolo de ingestão crônica de álcool e ao procedimento cirúrgico para confecção de um defeito ósseo em ambas as tíbias e tratados com LLLT (120J/cm<sup>2</sup>).

Ainda, todos os animais foram divididos em 2 subgrupos, compostos por 5 animais cada, para a realização das análises em diferentes períodos experimentais. Os animais do **subgrupo A** foram eutanasiados 7 dias após a confecção do defeito ósseo e os animais do **subgrupo B** foram eutanasiados 14 dias após a confecção do defeito ósseo. Abaixo segue um esquema representativo da divisão dos grupos e uma linha do tempo dos eventos experimentais (Figura 1).



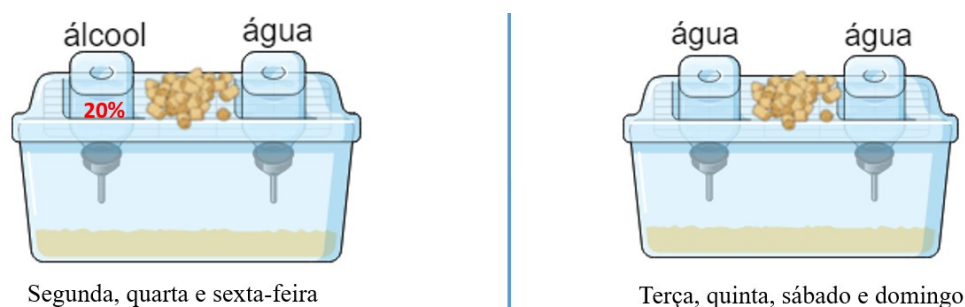
**Figura 1.** Esquema demonstrativo dos grupos experimentais



**Figura 2.** Organização cronológica dos protocolos experimentais.

### 3.3. Protocolo de ingestão crônica de álcool: Intermittent-access to 2 bottle choice (IA2BC)

Para a administração crônica de álcool aos animais, foi utilizado o paradigma de duas garrafas de acesso intermitente. Para isso foi ofertado continuamente uma garrafa contendo água e outra contendo álcool à 20% (v/v) sem adição de açúcares em três sessões semanais de 24 h de exposição (2ª, 4ª e 6ª feiras) durante 45 dias, totalizando 20 sessões de álcool. Na segunda-feira, após uma semana de habituação dos animais, foi ofertado para cada animal uma garrafa com solução de álcool 20% e outra garrafa com água. Após 24 h, a garrafa de álcool foi substituída por uma segunda garrafa de água, que esteve disponível pelas 24 h seguintes. Este padrão foi seguido às quartas e sextas-feiras. Os animais tiveram acesso ilimitado a duas garrafas de água aos finais de semana. A posição da garrafa de álcool foi alternada a cada sessão para evitar preferência por um dos lados. As soluções de álcool foram preparadas com água filtrada a partir de álcool absoluto 99,5% (v/v) (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema- SP) (SIMMS *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Ilustração esquemática do protocolo de ingestão oral intermitente de álcool

### 3.4. Modelo experimental de defeito ósseo na tíbia

O modelo de defeito ósseo adotado neste estudo foi utilizado nos trabalhos de Fernandes *et al.* (2013) e Magri *et al.* (2015), os quais foram realizados defeitos ósseos circulares de dimensões padronizadas na cortical da tíbia de ratos. Para a realização do defeito ósseo em ambas as tíbias, foi utilizado uma broca odontológica tipo trefina, da marca WMA - Brasil, com 2 cm de comprimento, 3 mm de diâmetro externo e acionada por um micromotor da marca BELTEC – Brasil com rotação de 13.500 rpm. A região de defeito foi irrigada constantemente com soro fisiológico para evitar a queimadura do tecido ósseo.

Após a anestesia, tricotomia digital e assepsia da área a ser operada, os defeitos ósseos foram realizados através de uma incisão no terço proximal da tíbia. A lesão foi realizada 10 mm abaixo da articulação do joelho do animal, sendo o local do defeito previamente medido com a utilização de paquímetro digital e a lesão realizada com a trefina mantida na posição horizontal e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar a cortical medial, sem atingir a face contralateral, promovendo um orifício de 3 mm de diâmetro. Finalizando, foi realizada sutura do tecido muscular e pele de cada animal utilizando fio de náilon monofilamentar 4.0 e distância de 1 cm entre os pontos e foi feita a limpeza local.

### 3.5. Tratamento com Laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT)

Para os grupos que foram submetidos a aplicação do LLLT, foi utilizado o aparelho Photon laser III (DMC® equipamentos Ltda, SP, São Carlos, Brasil) Diodo de Arsenieto de Gálio-Alumínio (GaAlAs) (Figura 2). Ainda, os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela

1. As regiões de defeito receberam irradiação local 1 ponto por contato direto, cada tibia, iniciando o tratamento imediatamente após a indução do defeito ósseo. As aplicações de LLLT foram sempre realizadas no mesmo horário. A eutanásia dos animais aconteceu 24 horas após a última sessão de tratamento. Ao final do experimento totalizaram três sessões de tratamento para os grupos eutanasiados 7 dias após a realização do defeito ósseo e sete sessões de tratamento para os grupos 14 dias após a realização do defeito ósseo.



**Figura 4.** Aparelho Photon laser III (DMC® equipamentos) utilizado neste estudo.

**Tabela 1.** Parâmetros da aplicação de LLLT

Parâmetros	
Comprimento de onda	808 nm (infravermelho)
Potência	100 mW
Tamanho do <i>spot</i>	0,028 cm <sup>2</sup>
Densidade de potência	3,57 W/cm <sup>2</sup>
Dose	120 J/cm <sup>2</sup>
Energia	3.36 J
Tempo de aplicação	33 s

### 3.6. Eutanásia e coleta do material

Primeiramente, os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina (80 mg/kg), xilazina (8 mg/kg), acepromazina (1 mg/kg/dose) e fentanil (0,05 mg/kg/dose). Em seguida, amostras de sangue foram coletadas para análises. Após, os animais foram

eutanasiados por meio de overdose de anestésico (cetamina (240 mg/kg) e xilasina (24 mg/kg)). Imediatamente após, foi realizada uma ressecção completa de ambas tíbias e seguido protocolos de processamento das amostras.

### **3.7. Análises**

#### **3.7.1. Análise da ingestão de álcool**

Os líquidos foram ofertados em garrafas de vidro com bicos de aço inoxidáveis graduadas com 250 ml para água e em 100 ml para o álcool, posicionadas na parte superior da gaiola. As garrafas de álcool foram medidas e pesadas 30 minutos antes e 24 h após serem ofertadas aos animais para o cálculo do consumo de álcool. As medidas foram realizadas em balança analítica de precisão. Além disso, foi realizado a medida diária da ingestão hídrica e também o controle semanal da ingesta de ração do animal e do peso do animal para que fosse possível o cálculo da quantidade de gramas de álcool ingeridas pelo peso corporal (g/kg/24h), onde:  $(\Delta \text{ peso da garrafa em 24 h de acesso à solução experimental} / \text{peso do animal em kg}) \times \text{g de EtOH na solução experimental (20\%)}$ .

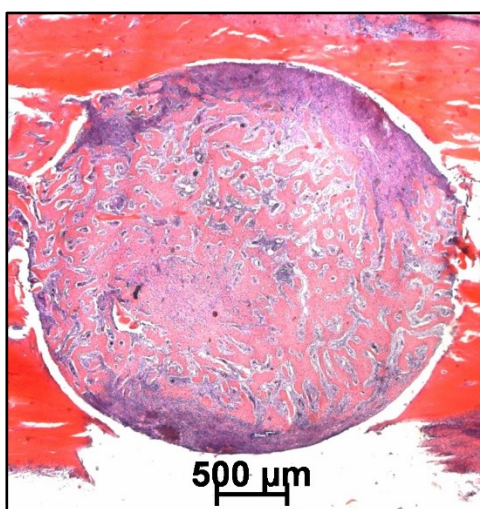
#### **3.7.2. Análise dos níveis séricos de etanol**

Dois grupos foram submetidos ao protocolo de administração oral de álcool e tiveram, além da medição da ingesta, uma amostra de sangue coletada ao final do experimento a fim de mensurar a concentração sérica de etanol. Ao 45º dia do protocolo de álcool, mesmo dia da eutanásia, uma amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca. A amostra foi armazenada em tubos Eppendorf heparinizados e centrifugados a 2300 rpm, a 4°C durante 15 min. Após este procedimento, o plasma foi extraído e a concentração de etanol no sangue analisada por meio do método espectrofotométrico, utilizando um kit para determinação da concentração de etanol (NAD-ADH Reagent Multiple Test Vial, Sigma N7160; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### **3.7.3. Análise histopatológica qualitativa**



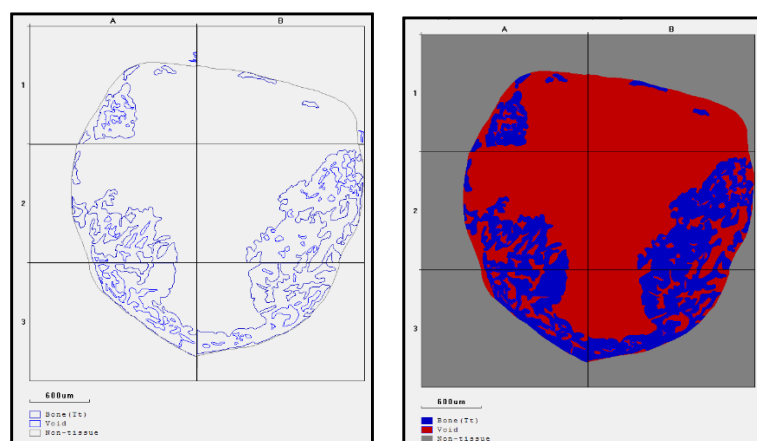
Os animais tiveram as tíbias dissecadas, fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas e submetidas à descalcificação em solução descalcificadora de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 10% por no mínimo 30 dias, para posterior processamento histológico. Após, as amostras foram processadas e incluídas em parafina. Para a confecção das lâminas, cortes com espessura de 5  $\mu\text{m}$  foram adquiridos utilizando um micrótomo e estes foram corados com hematoxilina e eosina (Figura 3). Foi realizada uma análise qualitativa das lâminas, através da descrição histopatológica da área da lesão que abordou os seguintes critérios: infiltrado inflamatório, tecido de granulação, tecido ósseo neoformado e organização tecidual óssea. Esta análise foi realizada por dois avaliadores treinados previamente.



**Figura 5.** Esquema demonstrativo do corte histológico do modelo de defeito ósseo adotado neste estudo. (Coloração: HE; Aumento: 5x; Escala: 500  $\mu\text{m}$ )

#### 3.7.4. Análise morfométrica

As análises morfométricas foram realizadas de forma quantitativa por um processo de quantificação da neoformação óssea presente na área de defeito ósseo, ou seja, baseado na imagem óssea delimitada, a fração do volume ósseo (BV/TV) foi mensurada dividindo o volume ósseo (BV) pelo volume total (TV) da região do defeito (Figura 4). Para a realização deste processo foram utilizadas as lâminas coradas com HE. A mensuração de todo tecido ósseo foi feita através do *software OsteoMeasure*, versão 1.2.0 (OsteoMetrics, Inc., Atlanta, GA) em um aumento de 100x e as médias dos valores foram expressas em porcentagem. Ainda, a análise foi realizada por dois avaliadores previamente treinados.



**Figura 6.** Análise da fração de volume de osso neoformado em área de defeito obtida através do Software *OsteoMeasure*.

### 3.7.5. Análise imuno-histoquímica

Estas análises foram realizadas na tíbia dos animais com objetivo de verificar a imunomarcagem de Runx-2. As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% por 24 horas, em seguida desmineralizados utilizando EDTA por aproximadamente 45 dias e então, submetidas ao processamento de inclusão em parafina histológica. A partir disso, foram obtidos cortes com espessura de 3 µm. Logo, as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e submetidas ao processo de bloqueio da peroxidase endógena. Após, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-Runx-2 (Santa Cruz Biotechnology, USA) por 24 horas. Então, os cortes foram incubados com anticorpo secundário por 30 minutos e revelados com DAB (3,3 diaminobenzidina – Sigma Chemical). Por último, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris. Após a marcação, as lâminas foram analisadas utilizando um aumento de 400x, utilizando um microscópio de luz (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha), varrendo todas as partes do defeito.

Ainda, a imunexpressão de Runx-2 foi avaliada qualitativamente, através da descrição do local de marcação e semi-quantitativamente de acordo com uma escala de pontuação descrita anteriormente de 1 a 4 (1 = ausente, 2 = leve, 3 = moderado e 4 = intenso) (MAGRI et. al., 2015).

### **3.7.6. Análise estatística**

Os dados foram analisados e expostos em forma de gráficos, sendo os valores expressos em média e erro padrão da média. A distribuição das variáveis foi testada utilizando o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para análise da comparação da ingestão de álcool e dosagem sérica foi utilizado o teste Mann-Whitney. Para as demais análises, com as variações classificadas dentro da distribuição normal (paramétricas) foi utilizada ANOVA com *post-hoc* de Tukey. Para as variações classificadas não paramétricas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p \leq 0.05$ ). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism versão 6.01.

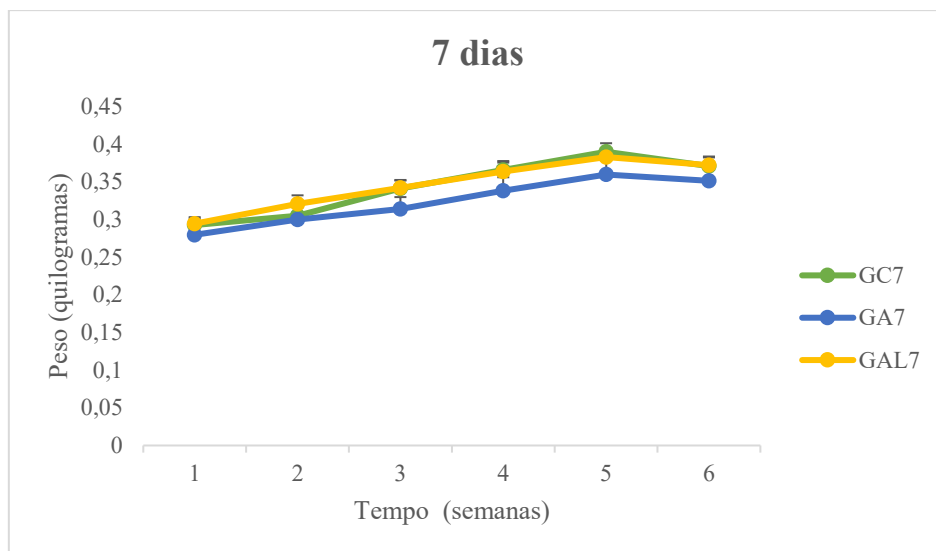
## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Achados gerais**

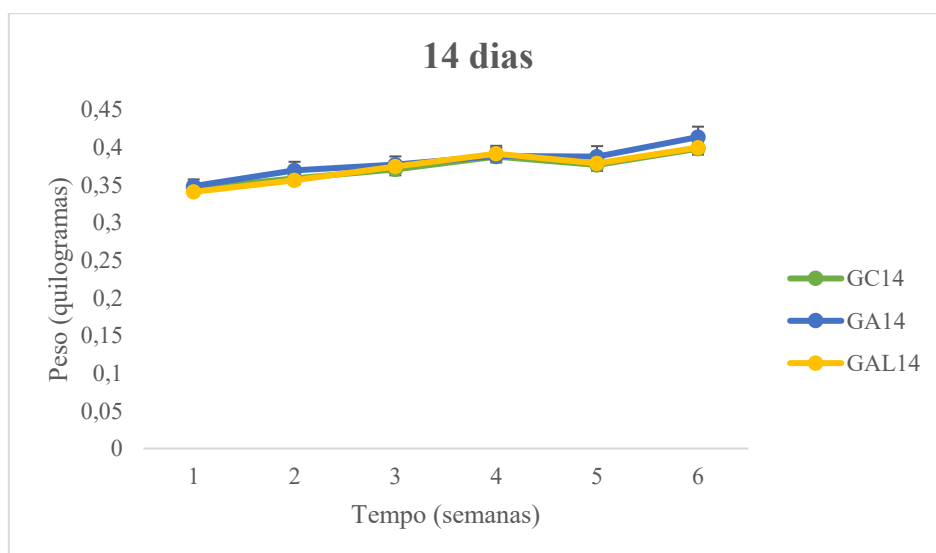
Nenhum sinal macroscópico de inflamação ou eventos adversos foram observados após o procedimento cirúrgico para indução do defeito ósseo e também, durante as aplicações de LLLT.

### **4.2. Peso dos animais**

A partir da análise dos pesos dos animais, pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos durante todo período experimental (Figura 5 e 6).



**Figura 7.** Médias  $\pm$  EPM semanais do peso em quilogramas dos grupos analisados 7 dias após o defeito ósseo. Teste de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn.  $p \leq 0,05$ .

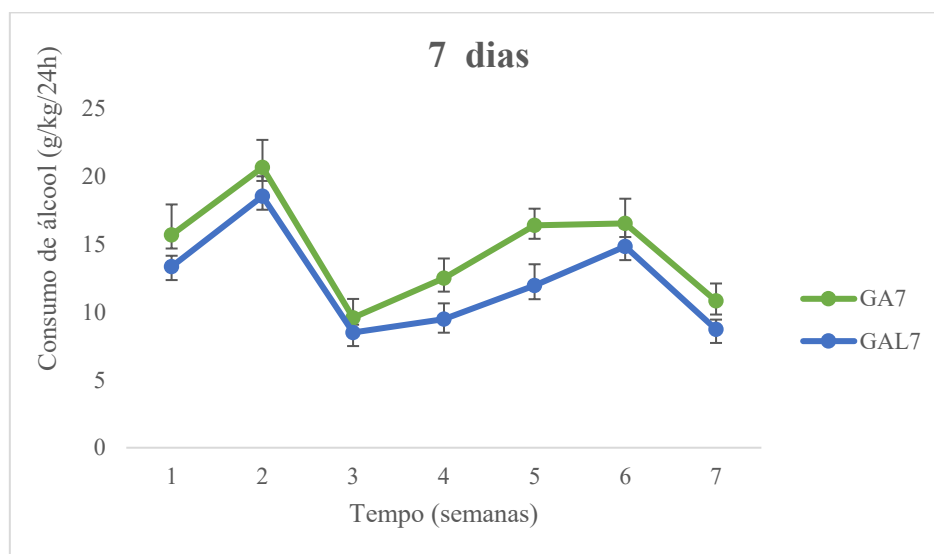


**Figura 8.** Médias  $\pm$  EPM semanais do peso em quilogramas dos grupos analisados 14 dias após o defeito ósseo. Teste de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn.  $p \leq 0,05$ .

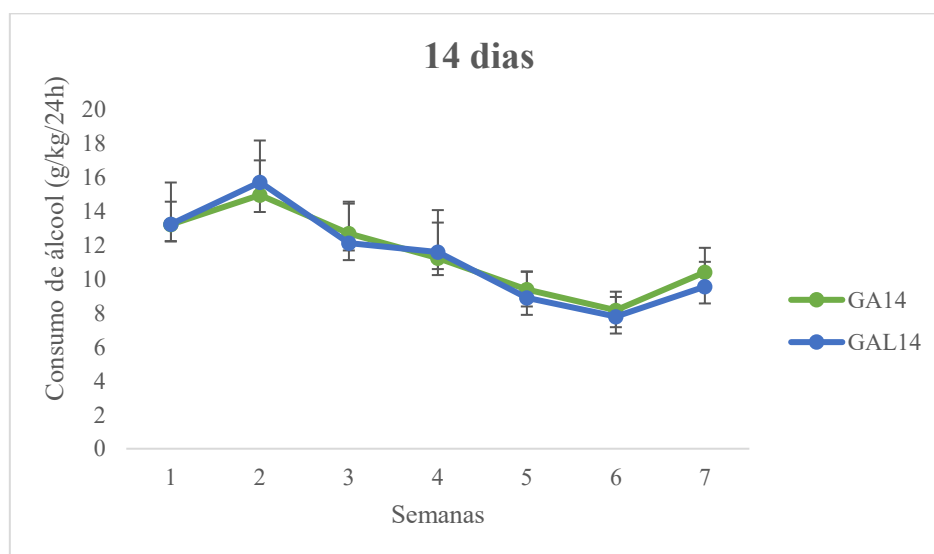
### 4.3. Análise da ingestão de álcool

Os grupos que foram submetidos ao protocolo de ingestão crônica de álcool (GA e GAL) apresentaram valores mais regulares a partir da terceira semana e sofreram discreta redução após a sexta e quinta semana de protocolo, sendo este o período que ocorreram as cirurgias para a realização dos defeitos ósseos, de acordo com cada período experimental (7 e 14 dias,

respectivamente). No entanto, não houve diferença significativa em nenhum período experimental entre os grupos (Figura 7 e 8).



**Figura 9.** Médias  $\pm$  EPM do consumo semanal de álcool em g/kg/24h dos grupos GA7 e GAL7. Teste Mann Whitney.  $p \leq 0,05$ .

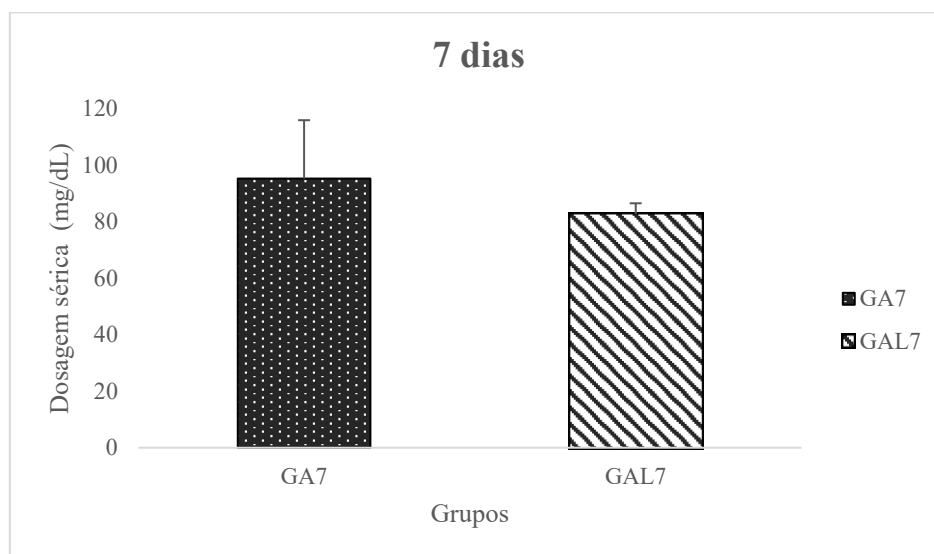


**Figura 10.** Médias  $\pm$  EPM do consumo semanal de álcool em g/kg/24h dos grupos GA7 e GAL7. Teste Mann Whitney.  $p \leq 0,05$ .

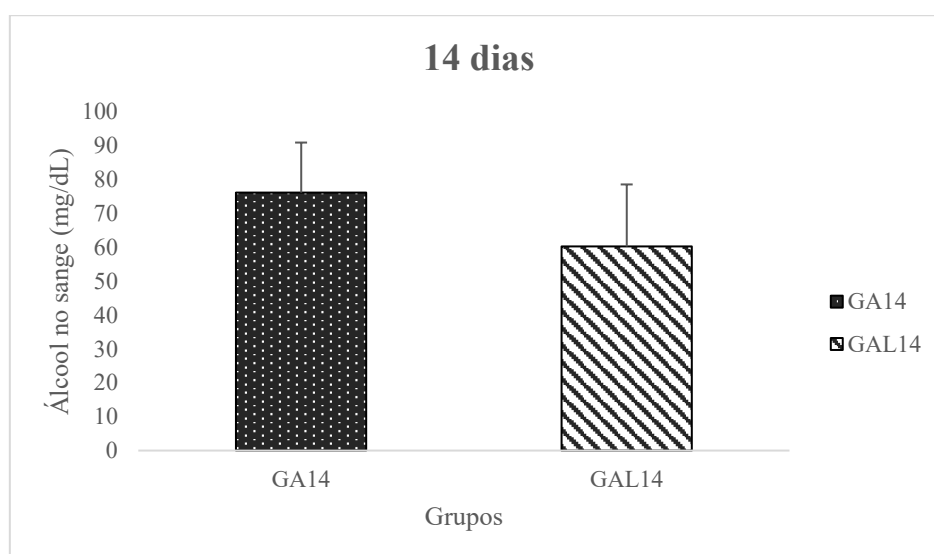
#### 4.4. Análise dos níveis séricos de álcool

Os resultados dos níveis séricos de álcool estão demonstrados nas Figuras 9 e 10. Não houve diferença significativa entre valores para GA e GAL em todos períodos experimentais

(7 e 14 dias). Este fato demonstra que estes grupos consumiram quantidades de álcool muito próximas.



**Figura 11.** Médias  $\pm$  EPM dos níveis séricos de álcool final do período experimental de 7 dias. Teste Mann Whitney.  $p \leq 0,05$ .



**Figura 12.** Médias  $\pm$  EPM dos níveis séricos de álcool final do período experimental de 7 dias. Teste Mann Whitney.  $p \leq 0,05$ .

#### 4.5. Análise histopatológica

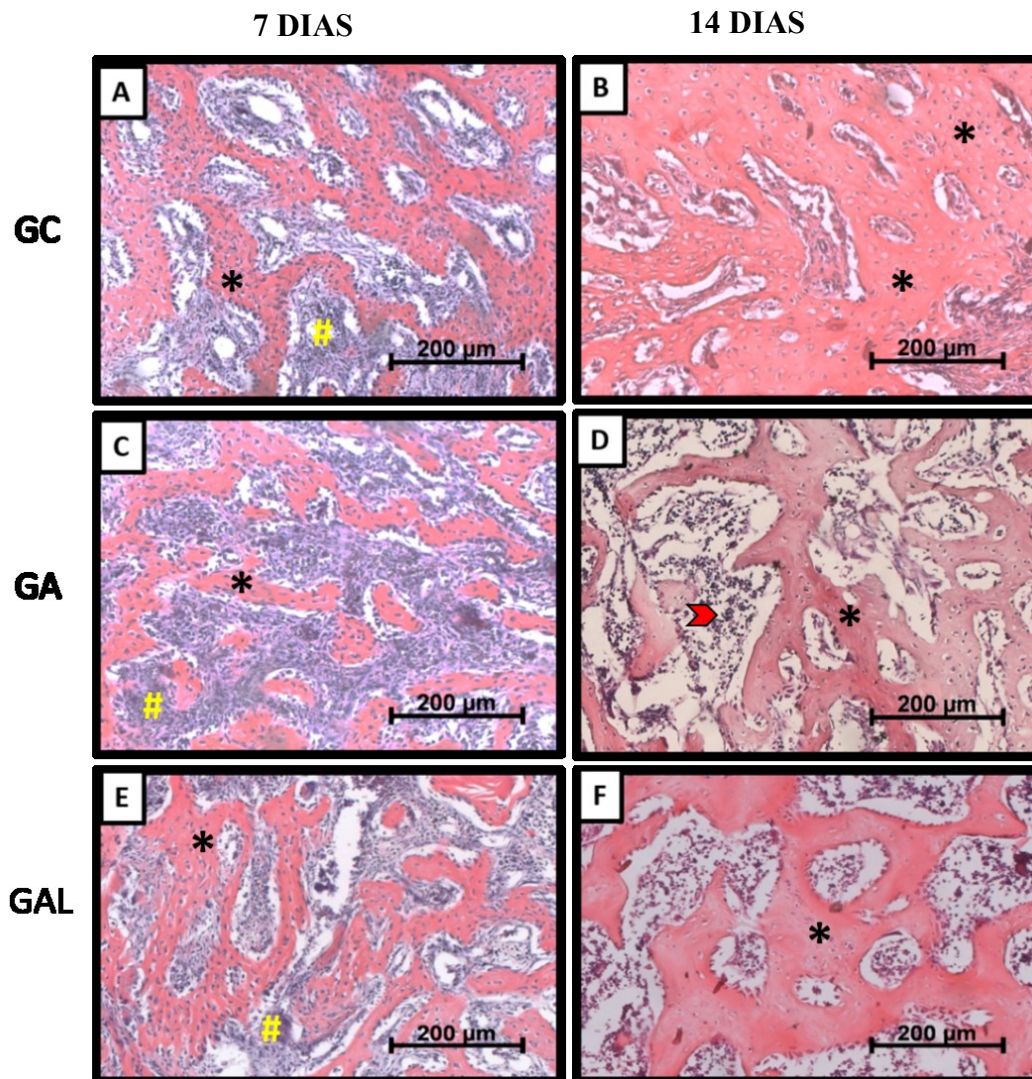
A figura 11 apresenta uma visão geral dos achados morfológicos obtidos a partir da análise qualitativa descritiva dos grupos pertencentes a ambos períodos experimentais.

#### **4.5.1. Sete dias após a realização do defeito ósseo**

Os defeitos ósseos analisados sete dias pós-lesão (Figura 11A, C, E) apresentaram todas as bordas da região do defeito ainda visíveis e mostrando um tecido ósseo ainda desorganizado. Em todos os grupos (GC, GA e GAL) foi observada intensa neoformação óssea. Entretanto, interessante, o GAL apresentou trabéculas ósseas mais interconectadas e mais espessas, quando comparado com o GA, assimilando-se mais ao GC (condição metabólica normal). Ainda, o GA e GAL, grupos submetidos ao protocolo de ingestão crônica de álcool, mostraram presença moderada a intensa de tecido de granulação, sendo este mais concentrado nas regiões centrais do defeito. Em adição, sobre a inflamação, nos grupos GC e GAL foi possível observar leve presença de infiltrado inflamatório no centro do defeito e uma maior quantidade no GA, sugerindo um possível retardo na fase de reparação ósseo, se comparado aos outros grupos.

#### **4.5.2. Catorze dias após a realização do defeito ósseo**

Os grupos analisados 14 dias após a cirurgia do defeito ósseo, mostraram trabéculas ainda mais grossas e interconectadas, como esperado para o tempo de reparo. Em relação ao osso neoformado, o GAL mais uma vez se assimilou ao GC, apresentando neoformação óssea mais intensa e melhor organização tecidual, com início da osteointegração, isto osso neoformado interconectado ao osso pré-existente. Ainda, foi observada a uma leve presença de tecido de granulação em todos os grupos analisados neste período (GC, GA e GAL) e ausência de infiltrado inflamatório.

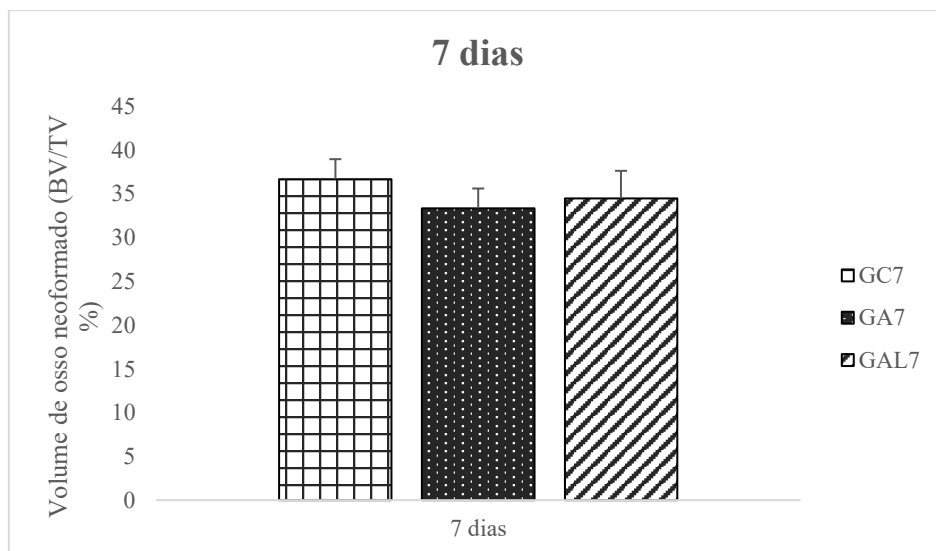


**Figura 13.** Defeito ósseo. A, B: animais sem tratamento (GC7 e GC14); C, D: animais submetidos à ingestão crônica de álcool (GA7 E GA14); E, F: submetidos à ingestão crônica de álcool e irradiados com LLLT (GAL7 e GAL14). Infiltrado inflamatório (#); tecido ósseo neoformado (\*); tecido medular (seta vermelha). Coloração HE; Aumento 20x; Escala: 200 µm.

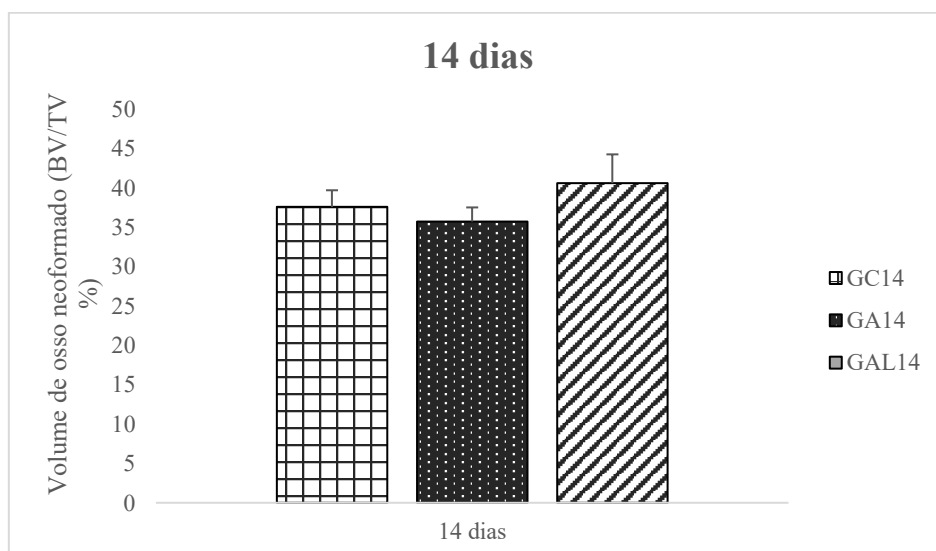
#### 4.6. Análise morfométrica

A Figura 12 e 13 mostram as médias da área de tecido ósseo neoformado após 7 e 14 dias do defeito ósseo, respectivamente. Em ambos períodos experimentais (7 e 14 dias) o GA apresentou valores inferiores aos demais grupos (GC e GAL), porém, não houve diferença significativa entre estes.





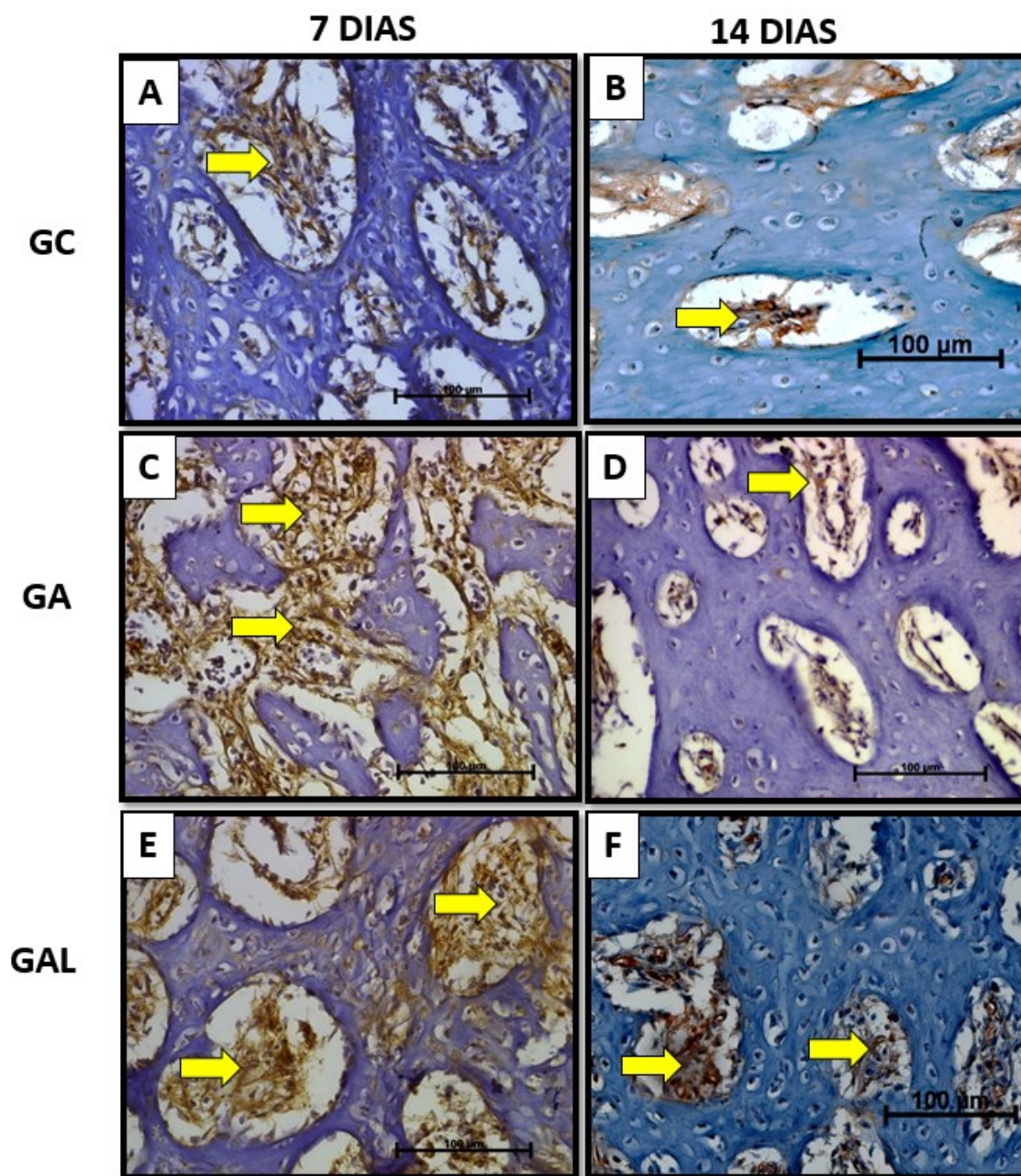
**Figura 14.** Médias  $\pm$  EPM do volume ósseo neoformado (%) na região do defeito ósseo 7 dias após a cirurgia. GC: controle; GA: álcool; GAL: álcool + laser. ANOVA *One-Way* seguida de *post-hoc* de Tukey.  $p \leq 0,05$ .



**Figura 15.** Médias  $\pm$  EPM do volume ósseo neoformado (%) na região do defeito ósseo 14 dias após a cirurgia. GC: controle; GA: álcool; GAL: álcool + laser. ANOVA *One-Way* seguida de *post-hoc* de Tukey.  $p \leq 0,05$ .

#### 4.7. Análise imuno-histoquímica

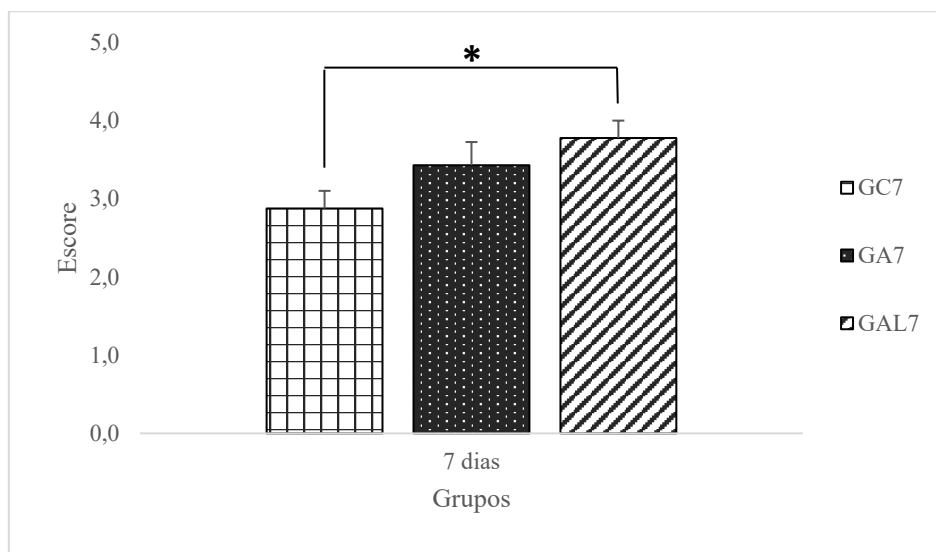
A avaliação descritiva qualitativa da imuno-histoquímica demonstrou uma imunoexpressão de Runx-2 principalmente entre as trabéculas ósseas neoformadas e em regiões de tecido medular de todos os grupos estudados (GC, GA e GAL), em todos os períodos analisados, porém, com menor imunorreação nos grupos GC (Figura 14A e B).



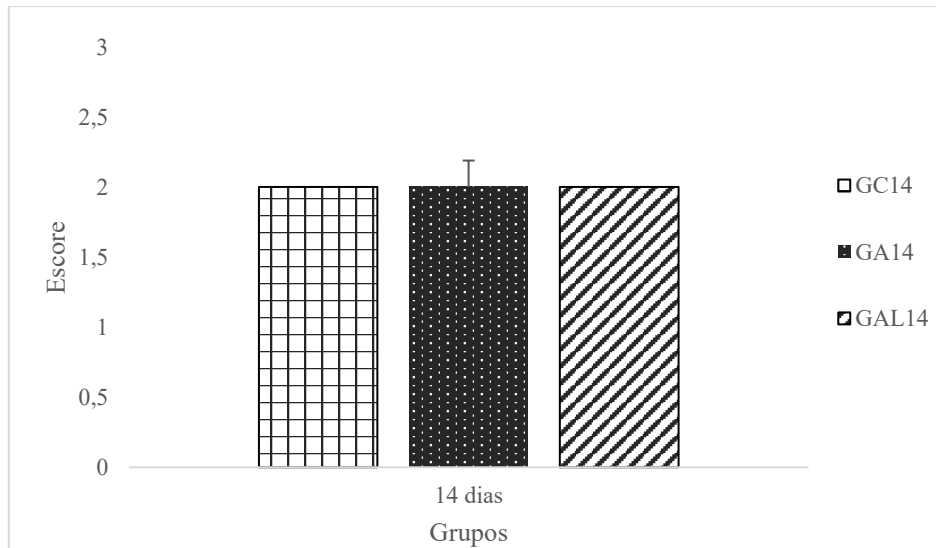
**Figura 16.** Fotomicrografias representativas no aumento de 400x da análise imuno-histoquímica dos defeitos ósseos. A, B: animais sem tratamento (GC7 e GC14); C, D: animais submetidos à ingestão crônica de álcool (GA7 e GA14); E, F: submetidos à ingestão crônica de álcool e irradiados com LLLT (GAL7 e GAL14). (\*) Indica imunomarcção de Runx-2. Escala: 100 µm.

Os resultados da análise semi-quantitativa estão demonstrados nas Figuras 15 e 16. Sete dias após a realização do defeito ósseo, o GAL apresentou um aumento significativo da imunoexpressão quando comparado com o GC ( $p = 0,0201$ ) (Figura 15). Nas demais comparações não houve diferença significativa. Ainda, catorze dias após a realização do defeito

ósseo, não possível evidenciar diferença significativa entre os grupos experimentais (GC, GA e GAL) (Figura 16).



**Figura 17.** Médias  $\pm$  EPM da análise semi-quantitativa da imunoreexpressão de Runx-2 7 dias após a cirurgia. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. \* $p = 0,0201$ ; GAL vs GC.



**Figura 18.** Médias  $\pm$  EPM da análise semi-quantitativa da imunoreexpressão de Runx-2 14 dias após a cirurgia. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.  $p \leq 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

O consumo de álcool está relacionado a danos em múltiplos órgãos e tecidos, incluindo cérebro, fígado, músculos e tecido ósseo (SCHUCKIT, 2009). Vários estudos têm demonstrado os efeitos danosos do álcool, especialmente, no tecido ósseo, como o desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea. Ainda, como consequência, estes efeitos negativos contribuem para um aumento dos casos de osteopenia e osteoporose e assim, aumento dos riscos de fraturas (GREIFFENSTEIN & MOLINA, 2008; JUNG *et al.*, 2011; TURNER, 2000; MARLEY *et al.*, 2015).

O presente estudo utilizou o protocolo de Simms e col. (2008) com o objetivo de avaliar a resposta *in vivo* da aplicação de LLLT no processo de reparo ósseo em ratos sob o consumo crônico de álcool em diferentes períodos experimentais. Assim, algumas análises gerais e no tecido foram realizadas, afim de enriquecer o conhecimento teórico e agregar informações para uma prática clínica da utilização deste tratamento na população etilista que sofreram fraturas ósseas.

O álcool causa uma restrição calórica importante devido ao seu alto valor energético (MANUREL *et al.*, 2012; RAMCHANDANI *et al.*, 2001). Entretanto, este é considerado uma fonte de “calorias vazias”, pois, faltam nutrientes essenciais como proteínas e vitaminas (REIS *et al.*, 2003). Assim, muitos estudos evidenciaram que pacientes dependentes de álcool apresentaram diminuição de peso, massa gorda e massa magra (MADDALOZZO *et al.*, 2009; GONZALEZ-REIMERS *et al.*, 2008). No presente estudo foi observado uma discreta tendência à redução do peso corporal dos animais que consumiram álcool, no entanto, não foi observado diferença significativa entre os grupos submetidos ao protocolo comparado semanalmente com o GC nos diferentes períodos experimentais. Acredita-se que a ausência de uma diferença significativa neste estudo foi devido ao número amostral e ao período experimental, relativamente curto. Ainda, sugere-se que um período experimental maior poderia demonstrar um prejuízo significativo do álcool sobre o metabolismo geral e consequente, redução do peso.

A dependência do álcool é simulada pelo protocolo intermitente à solução de álcool, o que reproduz o perfil do consumo escalonado e intensificado de dependentes desta substância, devido aos períodos de abstinência impostos entre as sessões (GEORGE *et al.*, 2012; AHMADIANTEHRANI *et al.*, 2013; BARAK *et al.*, 2015). Ainda, há evidências de que o consumo de álcool se estabiliza ( $> 4,5$  g/kg/24 h) a partir da terceira ou quarta semana de exposição (CARNICELLA, AMAMOTO *et al.*, 2009; SIMMS *et al.*, 2008). Em adição, valores de consumo de álcool acima de  $5,5$  g/ kg/24 h indicam um consumo excessivo e crônico. Estes fatos corroboram com os achados deste estudo, visto que todos os animais apresentaram um

consumo mais estável após a terceira semana e com valores acima do mínimo caracterizado como consumo excessivo. Desta maneira, pode-se afirmar que o protocolo de álcool adotado foi efetivo e representa as condições clínicas desta população.

Devido a fórmula molecular simples do álcool ( $C_2H_6O$ ) e sua toxicidade, este é rapidamente metabolizado pelo organismo e seus produtos eliminados. Assim, o pico plasmático é atingido após trinta a sessenta minutos da ingestão oral, sem alimento no estômago (SOARES, 2017). Desta maneira, o estado nutricional pode interferir diretamente nos valores de dosagem sérica de álcool. Os resultados deste trabalho demonstraram que os níveis séricos de álcool dos grupos submetidos ao protocolo (GA e GAL) estavam em uma mesma faixa de valores, não havendo diferença significativa entre os grupos. No entanto, os valores apresentados nesta análise foram inferiores aos apresentados na literatura (SOARES, 2017; CARNICELLA *et al.*, 2014; SIMMS *et al.*, 2008; BARAK, CARNICELLA, *et al.*, 2011). Acredita-se que estes dados estejam divergentes com a literatura devido o período de coleta sanguínea não ser logo após a ingestão de álcool e pela forma de coleta adotada (punção cardíaca), mas vale ressaltar que ambos grupos foram submetidos as mesmas condições.

Nos últimos anos o LLLT tem se destacado dentre os recursos terapêuticos utilizados pelos fisioterapeutas. É cada vez mais estudado e utilizado na clínica, devido ao baixo custo associado à técnica e às diversas evidências sobre a otimização do processo de reparo tecidual, especialmente no tecido ósseo (RENNO *et al.*, 2009; RENNO *et al.*, 2007; DORTBUDAK *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

A eficácia do *laser* está intimamente relacionada à escolha de uma fluência adequada. Isto acontece, pois existe uma janela terapêutica onde observa-se uma dose-resposta excelente onde a fotoestimulação efetiva está acima de um valor limiar, porém abaixo de um valor que induza a fotoinibição (KARU *et al.*, 2000). Assim, os parâmetros de laser adotados neste estudo foram baseados em trabalhos anteriores, nos quais foram obtidos resultados que evidenciaram que o LLLT acelerou o processo de reparo do osso.

No trabalho de Tim e col (2011), os animais eram saudáveis e foram tratados com oito sessões de LLLT (830nm), observando melhora da organização tecidual e neoformação óssea no sítio de lesão, assim como os resultados obtidos após desenvolvimento deste trabalho. Já o trabalho de Bossini e colabores (2012) se assemelha em alguns pontos específicos a este estudo, uma vez que tratou ratas com osteoporose (desequilíbrio na formação e remodelação óssea), com diferentes parâmetros de *laser* e obteve seus resultados mais importantes na fase intermediária de 14 dias, utilizando os mesmos parâmetros que este trabalho. Em ambas populações foi verificado uma neoformação óssea intensa com aumento dos escores da

morfometria óssea. Sugere-se que os resultados da análise morfométrica deste estudo não tenham sido significativos devido principalmente ao número da amostra pequeno e às doses estarem, provavelmente, inadequadas para esta população, visto as alterações metabólicas decorrentes do consumo crônico e excessivo de álcool. Estudos futuros devem propor doses experimentais a fim de obter melhores respostas teciduais desta população à irradiação. Ainda, interessante foi observado um volume de osso neoformado maior na área de defeito do GAL quando comparado ao GA e acredita-se que se o número de amostras fosse expandido, iria-se observar significância nestes valores, fortalecendo ainda mais a terapia com *laser*.

Os achados histológicos deste estudo demonstraram que o LLLT otimizou o processo de reparação, mostrando melhor organização do tecido ósseo na área de defeito e uma neoformação óssea intensa, sugerindo uma fase de reparo mais avançada se comparado ao grupo álcool sem tratamento, assimilando-se um pouco mais ao grupo controle, ou seja, em condições metabólicas normais. Estas mudanças são observadas devido aos potenciais deste recurso, observados e evidenciado em diversos trabalhos, como: a capacidade de melhorar o recrutamento de macrófagos para o sítio de lesão e a atividade fagocitária, aumentar a respiração mitocondrial e a síntese de ATP, incrementando a síntese de colágeno tipo I, a proliferação e a diferenciação celular de osteoblastos e fibroblastos em diferentes períodos do reparo, principalmente nos mais recentes (RENNO *et al.*, 2007; MANTINEO *et al.*, 2014).

Os efeitos anti-inflamatórios da LLLT são bem descritos na literatura, em especial ligação com este estudo, por diminuir TNF- $\alpha$  e IL-6, que rotineiramente estão aumentados no indivíduo etilista (MACEDO *et al.*, 2015). Assim, infere-se que estas reações desencadeadas pela ação terapêutica do LLLT podem contribuir para minimizar os efeitos deletérios do álcool no tecido ósseo, diminuindo a quantidade de ERO e, mais uma vez, modulando o processo inflamatório, de modo que seja observado a aceleração do reparo da fratura óssea nestes indivíduos e prevenindo a consequente, limitação ou perda de função. Por isso, sugere-se que outras análises possam ser realizadas no futuro para complementarem estes dados. Análises como a verificação dos níveis de RANKL, associado à atividade dos osteoclastos e correlacionado ao TNF- $\alpha$  e IL-6 (ANANDARAJAH, 2009) seriam interessantes, visto que estes apresentam-se aumentados nesta população.

O Runx-2 é uma proteína essencial para a diferenciação dos osteoblastos e morfogênese do osso (GRASSI *et al.*, 2011). Assim, os achados imuno-histoquímicos do estudo ajudam a compreender o papel da interação entre o álcool, LLLT e Runx-2, no que diz respeito à atividade dos osteoblastos. Alguns estudos apontam que o álcool interfere de forma negativa diretamente sobre os osteoblastos (TURNER, 2000; MAUREL *et al.*, 2012; CHAKKALAKAL

et al., 2005). Assim, existem na literatura diversos estudos que utilizam o LLLT e apresentam aumento na expressão de Runx-2, resultados observados com a realização deste estudo que veem ao encontro de diversos resultados apresentados na literatura (MAGRI *et. al.*, 2015; FERNANDES *et. al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012). Os resultados destes estudos apontam para aumento da expressão de Runx-2, desde a cultura de células, ao terceiro dia após a lesão, até períodos intermediários do reparo em ratos diabéticos. Assim os resultados apresentados por estudo corroboram com estes autores, pois da mesma forma o laser atuou como um modulador do processo de reparo ósseo, acelerando a formação de tecido de granulação, trabéculas de osso recente e organização do tecido, além do aumento significativo na expressão de RUNX2.

O laser nos parâmetros adotados, possivelmente atuou com um modulador em ratos sob ingestão crônica de álcool, assim como age em indivíduos sem transtornos metabólicos e morbidades associadas após um trauma ósseo, como mostra a literatura atual.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo demonstrou que o álcool quando consumido de maneira excessiva e crônica interfere negativamente no processo de reparo ósseo. Ainda, os resultados sugerem que o LLLT atua como um potencial modulador do reparo ósseo em etilistas, através da melhora na organização do tecido, aumento da neoformação óssea e aumento da imunomarcagem de Runx-2. Desta forma, pode-se concluir que o LLLT foi capaz de estimular o metabolismo ósseo e este recurso pode ser utilizado para acelerar processos de consolidação óssea em alcoólatras.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AARON, R. K.; CIOMBOR, D. M. SIMON, B. J. Treatment of nonunions with electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res*, n. 419, p. 21-9, 2004.
2. AHMADIANTEHRANI, S., BARAK, S. AND RON, D. GDNF is a novel ethanol-responsive gene in the VTA: implications for the development and persistence of excessive drinking. *Addiction Biology*, 19: p. 623–633. 2014
3. ALVISA-NEGRÍN J, GONZÁLEZ-REIMERS E., et al. Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol*, v. 44(5), p. 468-75, Sept/Oct. 2009.
4. ANANDARAJAH AP. Role of RANKL in bone diseases. *Trends Endocrinol Metab* 20:88–94. 2009
5. ATKINS GJ, ANDERSON P.H., et al. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone*, v. 40, p.1517–1528, 2007.
6. BARAK S, CARNICELLA S, YOWELL QV, RON D. Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses alcohol-induced allostasis of the mesolimbic dopaminergic system: implications for alcohol reward and seeking. *The Journal of Neuroscience*, 31: p. 9885–9894 ,2011.
7. BARAK, S., WANG, J., AHMADIANTEHRANI, S., BEN HAMIDA, S., KELLS, A. P., FORSAYETH, J., BANKIEWICZ, K. S. AND RON, D. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is an endogenous protector in the mesolimbic system against excessive alcohol consumption and relapse. *Addiction Biology*, 20, p. 629–642, 2015
8. BIKLE D.D., GENANT H.K., CANN C.E., RECKER R.R., HALLORAN B.P., STREWLER G.J: Bone disease in alcohol abuse. *Ann Intern Med*, n. 103, p. 42-48, 1985.
9. BLAKE R.B., BRINKER M.R., URSIC C.M., CLARK J.M., COX D.D. Alcohol and drug use in adults patients with musculoskeletal injuries. *Am J Orthop*, n. 26, p. 704-709, 1997.
10. BOSSINI, P. S.; RENNÓ, A. C.; RIBEIRO, D. A. et al. Low level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages. *Exp Gerontol*, v. 47, n. 2, p. 136-42, 2012.
11. BOSSINI, P.S.; RENNÓ, A.C.M.; RIBEIRO, D.A.; FANGEL, R. PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; PARIZOTTO, N.S. Biosilicate and low level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010.
12. BOUCHERY, E.E.; HARWOOD, H.J.; SACKS, J.J., et al. Economic costs of excessive alcohol consumption in the U.S., 2006. *American Journal of Preventive Medicine* v. 41(5), p.516– 524, 2011.
13. CARLINI E.A., GALDURÓZ J.C., et al. II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005. São Paulo: Páginas & Letras; 2007.



14. CARNICELLA S, Ron D, Barak S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol*, 48(3):243-52, 2014.
15. CARNICELLA S, YOWELL QV, RON D. Regulation of operant oral ethanol self-administration: a dose-response curve study in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 35: p. 116–125, 2011
16. CHAKKALAKAL D.A, NOVAK J.R, FRITZ E.D, MOLLNER T.J, MCVICKER D.L., et al. Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol*, v. 36, p. 201–214, 2005.
17. CHAPPARD D, PLANTARD B, PETITJEAN M, ALEXANDRE C, RIFFAT G. Alcoholic cirrhosis and osteoporosis in men: a light and scanning electron microscopy study. *J Stud Alcohol*, n. 52, p. 269–274, 1991.
18. CHAVASSIEUX P, SERRE CM, VERGNAUD P, DELMAS PD, MEUNIER PJ. In vitro evaluation of dose-effects of ethanol on human osteoblastic cells. *Bone Miner*, v. 22(2), p. 95-103, 1993.
19. CHEN JR, LAZARENKO OP, SHANKAR K, BLACKBURN ML, LUMPKIN CK, BADGER TM, RONIS MJ. Inhibition of NADPH oxidases prevents chronic ethanol-induced bone loss in female rats. *J Pharmacol Exp Ther*. V. 336, p. 734–742, 2011.
20. CHEN Y, GAO H, YIN Q, CHEN L, DONG P, ZHANG X, KANG J. ER stress activating ATF4/CHOP-TNF- $\alpha$  signaling pathway contributes to alcohol-induced disruption of osteogenic lineage of multipotential mesenchymal stem cell. *Cell Physiol Biochem*., v. 32, p. 743–754, 2013.
21. CHEUNG RC, GRAY C, BOYDE A, JONES SJ. Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. *Bone*, v. 16(1), p. 143-7, Jan. 1995.
22. COOK RT. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system - a review. *Alcohol Clin Exp Res*, n. 22, p. 1927–1942, 1998.
23. CREWS FT, BECHARA R, BROWN LA, et al. Cytokines and Alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* v. 30, p. 720–730, 2006.
24. DA SILVA, A.P.R.B., PETRI, A.D., CRIPPA, G.E. et al. *Lasers Med Sci*, 27: 777, 2012.
25. *Department of Health and Human Services-HHS & Department of Agriculture-USDA* 2000.
26. DIAMOND T, STIEL D, LUNZER M, WILKINSON M, POSEN S: Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. *Am J Med*, n. 86(3), p. 282-8, mar. 1989.
27. DORTBUDAK, O., HASS, R., MALLATH-POKORNY, G. (2000). Bioestimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 11, p. 540–545, 2000.
28. DUCKWORTH AD, BENNET SJ, ADERINTO J, KEATING JF. Fixation of intracapsular fractures of the femoral neck in young patients: risk factors for failure. *J Bone Joint Surg Br.*, v. 93, p. 811–816, 2011.
29. FÁVARO-PIPI, E.; FEITOSA, S. M.; RIBEIRO, D. A. et al. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci*, v. 25, p. 727-732, 2010.

30. FÁVARO-PIPI, E.; RIBEIRO, D. A.; RIBEIRO, J. U. et al. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomed Laser Sur*, v. 29, n. 5, p. 311-317, 2011.
31. FERNANDES, K. R.; RIBEIRO, D. A.; RODRIGUES, N. C. et al. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. *J Biomed Opt*, v. 18, n. 3, p. 038002, 2013.
32. FOULK DA, SZABO RM. Diaphyseal humerus fractures: natural history and occurrence of nonunion. *Orthopedics*, v. 18, p. 333–335, 1995.
33. FUJIMOTO K, KIYOSAKI T, MITSUI N, MAYAHARA K, OMASA S, SUZUKI N, SHIMIZU N. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers Surg Med*, n. 42(6), p. 519-26, 2010.
34. GEORGE O, SANDERS C, FREILING J, et al. Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *PNAS*, 109(44): p. 18156-61, 2012.
35. GIULIANI N, GIRASOLE G, VESCOVI PP, PASSERI G, PEDRAZZONI M (1999) Ethanol and acetaldehyde inhibit the formation of early osteoblast progenitors in murine and human bone marrow cultures. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 23, p. 381–385, 1999.
36. GONZALEZ-CALVÍN JL, GARCIA-SANCHEZ A, BELLOT V., et al. Mineral metabolism, osteoblastic function and bone mass in chronic alcoholism. *Alcohol Alcohol*, n. 28(5), p. 571-9, Sept. 1993.
37. GRASSI FR, CICCOLELLA F, D'APOLITO G, et al.. Effect of low-level laser irradiation on osteoblast proliferation and bone formation. *J Biol Regul Homeost Agents* 25:603–6, 2011.
38. GREIFFENSTEIN P, MOLINA PE. Alcohol-induced alterations on host defense after traumatic injury. *J Trauma*, n. 64(1), p. 230-40, Jan. 2008.
39. HERNANDEZ E.R., REVILLA M., RICO H. Total body bone mineral and pelvis bone mineral content as parameters of bone mass in men. A dual-energy X-ray absorptiometry study. *Acta Anat*, v. 142, p. 227–230, 1991.
40. HOFBAUER LC, LACEY D.L., et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, v. 25, p. 255–259, 1999.
41. ISRAEL Y, ORREGO H, et al. Identification of alcohol abuse: thoracic fractures on routine chest X-rays as indicators of alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*, n. 4 (4), p. 420-2, 1980.
42. JÄNICKE-LORENZ J, LORENZ R. Alcoholism and fracture healing: A radiological study in the rat. *Arch Orthop Trauma Surg*, v. 103, p. 286–289, 1984.
43. JUNG MK, CALLACI JJ, et al. Alcohol Exposure and Mechanisms of Tissue Injury and Repair ALCOHOL. *Clin Exp Res*, v. 35 (3), p. 392-399, 2011.
44. KARU, TI, LUBART, R, (2000). Effects of Low-Power Light on Biological Systems V. *Proceedings of SPIE*. Amsterdam, Netherlands, p. 01–17, 2000.

45. KIYOSAKI T, MITSUI N, SUZUKI N, SHIMIZU N (2010) Low-level laser therapy stimulates mineralization via increased RUNX-2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. *Photomed Laser Surg* v. 28, p. S16–S172, 2010.
46. KLEIN RF, CARLOS AS. Inhibition of osteoblastic cell proliferation and ornithine decarboxylase activity by ethanol. *Endocrinology*, n. 136(8), p. 3406-11, Aug. 1995.
47. KRISTENSSON H, LUNDÉN A, NILSSON BE. (1980) Fracture incidence and diagnostic roentgen in alcoholics. *Acta Orthop Scand.*, v. 51, p. 205–7, 1980.
48. LIM, S.S.; VOS, T.; et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* v.380, p.2224–2260, 2012.
49. LOW, JOHN; REED, ANN. *Eletroterapia explicada: princípios e prática*. 4ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
50. MACEDO, A.B.; et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. *PLoS One*, Jun 17, 2015
51. MADDALOZZO GF, TURNER RT, EDWARDS CH, HOWE KS, WIDRICK JJ, ROSEN CJ, IWANIEC UT. *Osteoporos Int.*, n. 20(9), p. 1529-38, Sept. 2009.
52. MAGRI AM, FERNANDES KR. et al. Photobiomodulation and bone healing in diabetic rats: evaluation of bone response using a tibial defect experimental model. *Lasers Med Sci.* v.30, n.7, p. 1949-57, 2015.
53. MANTINEO, M.; PINHEIRO, J.P.; MORGADO, A.M. Low-level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. *J Biomed Opt*, 2014.
54. MARLEY W, KELLY G, THOMPSON N. Alcohol-Related Fracture Admissions: A Retrospective Observational Study. *The Ulster Medical Journal*, n.84(2), p.94-97, 2015.
55. MATHOG RH, TOMA V, CLAYMAN L, WOLF S. Nonunion of the mandible: an analysis of contributing factors. *J Oral Maxillofac Surg.*, v. 58, p. 746–752, 2000.
56. MAUREL D. B., BOISSEAU N., et al. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporosis International*, v. 23, n. 1, p. 1, 2012
57. MAUREL DB, PALLU S, JAFFRÉ C, FAZZALARI NL, BOISSEAU N, UZBEKOV R, BENHAMOU CL, ROCHEFORT GY. Osteocyte apoptosis and lipid infiltration as mechanisms of alcohol-induced bone loss. *Alcohol Alcohol.*v. 47, p. 413–422, 2012.
58. MEHTA, S. K.; BREITBART, E. A.; BERBERIAN, W. S. et al. Bone and wound healing in the diabetic patient. *Foot Ankle Clin*, v. 15, n. 3, p. 411-37, 2010.
59. NASCIMENTO, S. B.; CARDOSO, C. A.; RIBEIRO, T. P. et al. Effect of low-level laser therapy and calcitonin on bone repair in castrated rats: a densitometric study. *Photomed Laser Sur*, v. 28, n. 1, 2010.

60. O'BRIEN J.R., LU B., et al. Alcohol dependence is independently associated with sepsis, septic shock, and hospital mortality among adult intensive care unit patients. *Crit Care Med.*, v. 35, p. 345–350, 2007.
61. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE (OMS). Relatório Mundial de acidentes no trânsito e prevenção. Geneva: WHO; 2004.
62. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE (OMS). Relatório Mundial sobre Álcool e Saúde. Geneva: WHO; 2014.
63. PAVIA CS, LAMOTHE M, KAVANAGH M. Influence of alcohol on antimicrobial immunity. *Biomed Pharmacother.*, v. 58, p. 84–89, 2004.
64. PERLMAN MH, THORDARSON DB. Ankle fusion in a high risk population: an assessment of nonunion risk factors. *Foot Ankle Int.*, v. 20, p. 491–496, 1999.
65. RAMCHANDANI V.A, BOSRON W.F., Research advances in ethano metabolism. *Pathologie Biologie*, 49, p. 676-82, 2001
66. REIS FB, NETO JSH, PIRES RES. Pseudartrose. *Rev Bras Ortop.*, n. 40 (3), p. 79- 88, 2005.
67. REIS, N.T.; RODRIGUES, C.S.C. - Nutrição clínica no alcoolismo. Rio de Janeiro, Rubio, p.303, 2003.
68. RENNO, A.C., MCDONNELL, A., PARIZOTTO, N.A., AND LAAKSO, E.L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed. Laser Surg.*, v. 25, p. 275–280, 2007.
69. SANTORI C, CECCANTI M, DIACINTI D., et al. Skeletal turnover, bone mineral density, and fractures in male chronic abusers of alcohol. *J Endocrinol Invest*, v. 31, p. 321–326, 2008.
70. SCHUCKIT MA Alcohol-use disorders. *Lancet* 373: p.492–501, 2009
71. SIMMS JA., STEENLAND P, MEDINA B, ABERNATHY KE, CHANDLER LJ, WISE R, BARTLETT SE. Intermittent Access to 20% Ethanol Induces High Ethanol Consumption in Long–Evans and Wistar Rats. *Alcohol Clin Exp Res.*; n. 32(10), p. 1816–1823, 2008.
72. SOARES, MARINA BARBOSA A. Avaliação de consume e preferência de álcool após procedimentos de indução a dependência em ratos. Tese de dissertação de Mestrado- Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
73. STEIN, A., BENAYAHU, D., MALTZ, L., AND ORON, U. Lowlevel laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed. Laser Surg.*, v. 23, p. 161–166, 2005.
74. SUH KT, KIM SW, ROH HL, YOUN MS, JUNG JS. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*, v. 431, p. 220–225, 2005.
75. SWEARINGEN A, GHAEMMAGHAMI V, et al. Extreme blood alcohol level is associated with increased resource use in trauma patients. *Am Surg.*, v. 76, p. 20-4, 2005.

76. SZABO, G., AND MANDREKAR, P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* v. 33, p.220–232, 2009.
77. TIM, C. R.; PINTO, K. N.; ROSSI, B. R. et al. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers Med Sci*, 2013.
78. TREVISIOL CH, TURNER RT, PFAFF JE, HUNTER JC, MENAGH PJ, HARDIN K, HO E, IWANIEC UT. Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone*, v. 41, p.175–180, 2007.
79. TURNER, R. T. Skeletal Response to Alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24: 1693–1701, 2000.
80. TURNER, R. T., ROSEN, C. J., & IWANIEC, U. T. Effects of Alcohol on Skeletal Response to Growth Hormone in Hypophysectomized Rats. *Bone*, 46(3), 806–812, 2010.
81. VERNEJOUL MC, BIELAKOFF J, et al (1983). Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle aged men. *Clin Orthop Relat Res.*, v. 179, p. 107–115, 2007.
82. VIGNESH R.C., SITTA DJODY S., et al. Effect of ethanol on human osteosarcoma cell proliferation, differentiation and mineralization. *Toxicology*, n. 220(1), p. 63-70, 2006.
83. WEZEMAN F.H., EMANUELE M.A., et al. Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 23, p. 1534 –1542, 2000.
84. WIESE, A.; PAPE, H. C. Bone defects causes by high-energy injuries, bone loss, infected nonunions, and nonunions. *Orthop Clin North Am*, v. 41, n. 1, p. 1-4, 2010.
85. WILLIAMS JK, BAPTISTA PM, DAUNAIS JB, SZELIGA KT, FRIEDMAN DP, SOKER S. The effects of ethanol consumption on vasculogenesis potential in nonhuman primates. *Alcohol Clin Exp Res.*, n. 32(1), p. 155-61, 2008.

## 8. ANEXO



Universidade Federal de São Paulo

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 28 de setembro de 2015

CEUA N: 9613270815

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Isabel Cristina Céspedes, Stephanie de Souza Fermino

Depto/Disc: Departamento de Biociências

UNIFESP – Campus Baixada Santista

Título do projeto: "Efeitos da Laserterapia sobre o Processo de Reparo Ósseo em Ratos sob influência da Ingestão Crônica de Álcool".

### **Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP**

Resumo do Projeto: O consumo crônico de álcool está associado com estadias prolongadas em hospitais, alto número de encaminhamentos para unidades de terapia intensiva após lesões e agravamento no reparo de fraturas ósseas. No tecido ósseo, mesmo quantidades modestas de álcool têm efeitos rápidos sobre seu metabolismo. O etanol diminui a formação óssea de uma forma dependente da dose, através de um efeito tóxico direto sobre a função dos osteoblastos e alterando vias de sinalização relacionadas à resposta de defesa pós-lesão. Enquanto o consumo agudo de álcool mostra benefícios para a inflamação, o consumo crônico parece levar a um aumento excessivo na resposta celular pró-inflamatória. O processo inflamatório regulado associado ao defeito ósseo/fratura, é necessário para a remoção do tecido lesionado e promove a remodelação óssea pela interação com as células do osso. A terapia a laser de baixa intensidade é uma alternativa promissora no tratamento de lesões ósseas, além do recurso apresentar um potencial reparador no osso, constitui um método não invasivo e apresenta custos relativamente baixos. O laser pode elevar os níveis de fatores de crescimento e citocinas encontradas no reparo de lesões. Os objetivos deste trabalho incluem analisar a ação Espécie: Rato heterogêneo Gênero: Machos Peso: 300 gramas idade: 7 semanas Linhagem: Wistar Instalação: Gaiola Tipo de cama: Maravalha N por área: 5 / gaiola N: 30 Procedência: CEDEME Manutenção: Guarda de animais do Departamento de Biociências da UNIFESP - Santos Condições de alojamento: Alimentação: Padrão Fonte de água: Torneira Exaustão de ar: Sim do laser de baixa intensidade no processo de reparo ósseo em ratos sobre a influência da ingestão crônica de álcool. Para isso 30 ratos Wistar adultos serão divididos em três grupos: lesão (n=10), lesão+álcool (n=10) e lesão+álcool+laser (n=10). Cada grupo será subdividido em dois grupos de 5 animais cada, um para análise em 3 dias pós-lesão (n=15) e outro para 7 dias pós-lesão (n=15). A administração de álcool será realizada pelo protocolo do paradigma de duas garrafas com acesso a uma garrafa de água e outra contendo solução de álcool 20%, 3 dias por semana durante 45 dias. O defeito ósseo será induzido por uma broca odontológica do tipo trefina na calvária dos animais e o tratamento com laser iniciará imediatamente após a lesão. Serão realizados cortes histológicos transversais para análise qualitativa do processo inflamatório, tecido de granulação, área de necrose e estrutura do tecido; análise imunoistoquímica da expressão de RUNX2 e RANKL. A comparação entre os resultados quantitativos dos grupos controle e tratados será realizada através de Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

ANIMAIS – Serão utilizados:

30 Ratos heterogênicos Wistar, Machos, idade: 7 semanas

Procedência: CEDEME

Manutenção: Guarda de animais do Departamento de Biociências da UNIFESP - Santos

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, na reunião de 24/09/2015, **ANALISOU e APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo

Atenciosamente,



Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)